

Annexin V-EGFP/PI细胞凋亡检测试剂盒

Annexin V-EGFP / PI Apoptosis Detection Kit

本产品冰袋运输；避光保存于2~8℃，保质期12个月。

货号规格

货号	规格
CX005S	20次
CX005	50次
CX005L	100次

产品简介

细胞凋亡 (Apoptosis) 是最常见的细胞死亡方式之一，其受到基因的严格调控。细胞凋亡过程常伴随着明显的细胞形态学变化，比如，细胞凋亡早期，质膜内侧的磷脂酰丝氨酸 (phosphatidylserine, PS) 会翻转到细胞质膜表面；而在凋亡的中后期，随着细胞质膜的通透性的增大，一些较大分子的化合物，如碘化丙啶 (Propidium Iodide, PI, 一种 DNA 结合染料)，便可自由扩散进入细胞，将细胞核染上红色荧光。

Annexin V(膜联蛋白-V) 是一种分子量为 35~36 kDa 的 Ca^{2+} 依赖性磷脂结合蛋白，能与磷脂酰丝氨酸高亲和力特异性结合。本试剂盒采用与绿色荧光蛋白 (EGFP) 融合的 Annexin V 作为检测磷脂酰丝氨酸的探针，配合碘化丙啶 (PI)，通过使用流式细胞仪、荧光显微镜或其它荧光检测设备，可以快速检测细胞凋亡。Annexin V-EGFP 凋亡检测试剂盒对细胞群进行染色后，早期凋亡细胞显示绿色荧光，晚期凋亡细胞及坏死细胞显示红色和绿色荧光，活细胞几乎没有荧光。

产品内容

组分	CX005S	CX005	CX005L
Annexin V-EGFP	100 μ L	250 μ L	500 μ L
碘化丙啶(PI)	200 μ L	500 μ L	1 mL
结合缓冲液(10 $\times$)	10 mL	25 mL	50 mL

注意事项

- 如进行流式检测，建议使用 **Annexin V-FITC/PI细胞凋亡检测试剂盒** (货号：CX006)，实验结果会更理想，如使用本产品进行流式检测，需按以下操作：
 - ▶ 流式检测需设置三个对照样品来校准：
 - 空白管：仅用1 $\times$ 结合缓冲液重悬的细胞，以评估自身荧光水平，并相应地调整仪器；
 - 单染管：分别用 **Annexin V-EGFP** 或碘化丙啶(PI)染色，以确定每个细胞群体的边界。
 - ▶ 流式细胞仪检测时，使用 **FITC** 通道(通常是FL1)检测 **Annexin V-EGFP**；**phycoerythrin**通道(通常是FL2)检测**PI**。用 **CellQuest** 等软件进行分析，以 **EGFP** 为横坐标，**PI** 为纵坐标，绘制双色散点图(two-color dot plot)；
- 如使用含 **EDTA** 的胰酶消化细胞，有必要在染色之前用 **PBS** 或 **结合缓冲液** 洗涤细胞两次以去除 **EDTA**，从而避免螯合 **Annexin V** 所必需的 Ca^{2+} ；

3. 建议细胞在染色后1h之内完成检测；
4. 实验操作过程需尽量轻柔，从而最大限度地保留凋亡的细胞；
5. 试剂在开盖前请短暂离心，将管盖及内壁上的液体甩至管底，以避免开盖时液体洒落；
6. **Annexin V-EGFP** 和 **PI** 是光敏物质，在操作时请注意避光；
7. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作；
8. 本产品仅限科研使用。

操作步骤

对于悬浮细胞

1. 用无菌去离子水将 **结合缓冲液 (10×)** 稀释成 1× 结合缓冲液；
2. 离心收集细胞 ($500\sim1,000 \times g$, 5 min)；
3. 加入预冷的 **PBS(pH 7.4)** 轻轻重悬细胞,用移液器轻柔吹打洗涤,离心收集细胞,共洗涤两次；
4. 用 1× 结合缓冲液重悬细胞,使细胞浓度达到 1×10^6 cells/mL；
5. 吸取 100 μ L 细胞悬液 (细胞总数为 1×10^5 cells) 至一新 EP 管中,加入 5 μ L **Annexin V-EGFP** 和 5~10 μ L **碘化丙啶 (PI)**,轻轻混匀,室温避光孵育 10~15 min；
6. 染色孵育后,每管加入 800 μ L 1× **结合缓冲液**,轻轻混匀,离心 ($500 \times g$, 5 min),去上清；
7. 向管中加入 100 μ L 或合适上样体积的 1× **结合缓冲液**,轻轻重悬细胞,即可涂片后在荧光显微镜下进行观察,或立即进行流式细胞仪检测。

对于贴壁细胞

1. 用无菌去离子水将 **结合缓冲液 (10×)** 稀释成 1× 结合缓冲液；
2. 首先将细胞培养液吸出至一新离心管内,接着用预冷的 **PBS(pH 7.4)** 轻柔地洗涤贴壁细胞一次,加入适量胰酶细胞消化液 (不含 **EDTA**),室温孵育至轻轻吹打可以使贴壁细胞脱落下来即可,吸除胰酶细胞消化液。需避免胰酶的过度消化,以免造成假阳性；
3. 在细胞中加入上一步骤收集的细胞培养液,稍混匀,转移至离心管内,离心 ($500\sim1,000 \times g$, 5 min),弃上清,收集细胞；
注意：加入步骤 1 中的细胞培养液一方面可以收集已经悬浮的发生凋亡或坏死的细胞,另一方面细胞培养液中的血清可以有效抑制或中和残留的胰酶；残留的胰酶会消化并降解后续加入的 **Annexin V-EGFP** 导致染色失败。
4. 加入预冷的 **PBS(pH 7.4)** 轻轻重悬细胞,用移液器轻柔吹打洗涤,离心收集细胞,共洗涤两次；
5. 用 1× 结合缓冲液重悬细胞,使细胞浓度达到 1×10^6 cells/mL；
6. 吸取 100 μ L 细胞悬液 (细胞总数为 1×10^5 cells) 至一新 EP 管中,加入 5 μ L **Annexin V-EGFP** 和 5~10 μ L **碘化丙啶 (PI)**,轻轻混匀,室温避光孵育 10~15 min；
7. 染色孵育后,每管加入 800 μ L 1× **结合缓冲液**,轻轻混匀,离心 ($500 \times g$, 5 min),去上清；
8. 向管中加入 100 μ L 或合适上样体积的 1× **结合缓冲液**,轻轻重悬细胞,即可涂片后在荧光显微镜下进行观察,或立即进行流式细胞仪检测。